



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Off nlegungsschrift  
⑩ DE 44 08 152 A 1

⑳ Aktenz ichen: P 44 08 152.9  
㉑ Anmeldetag: 11. 3. 94  
㉒ Offenlegungstag: 14. 9. 95

㉓ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 12 N 11/08**  
C 12 N 9/14  
C 12 N 9/20  
C 07 C 67/02  
C 07 C 67/08  
C 07 C 27/02  
C 11 B 3/00  
C 11 B 3/10  
C 07 C 1/36  
// C07C 69/157,  
69/24,69/30

DE 44 08 152 A 1

㉔ Anmelder:  
Studiengesellschaft Kohle mbH, 45481 Mülheim, DE

㉕ Vertreter:  
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,  
50667 Köln

㉖ Erfinder:  
Reetz, Manfred T., 45470 Mülheim, DE; Simpelkamp,  
Jörg, 45470 Mülheim, DE; Zonta, Albin, 45470  
Mülheim, DE

㉗ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE 25 16 935  
WO 90 12 092  
JP 91 79 091 A  
SU 16 96 475 A1

Chemical Abstracts: Vol.108,1988,Ref.146245d;  
Vol.112,1990,Ref. 3544x;  
Vol.118,1993,Ref. 58172d;

㉘ Immobilisierte Lipasen in hydrophoben Sol-Gel-Materialien

㉙ Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Lipasen  
durch Reaktion an einer Siliciumoxidmatrix, die über Si-  
C-Bindungen organische, nicht hydrolysierbare Substituen-  
ten enthält.

DE 44 08 152 A 1

Die folgend n Angaben sind den vom Anmelder eing reichten Unterlagen entn mmen

BUNDESDRUCKEREI 07. 95 508 037/366

12/38

## Beschreibung

Gegenstand der Erfindung sind Enzymimmobilisate, welche durch Aufbau einer hydrophoben Matrix auf Siliciumoxidbasis nach dem Sol-Gel-Verfahren in Gegenwart von Lipasen hergestellt wurden, das Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ihre Anwendung.

Der Einsatz von Lipasen für technische Anwendungen findet zunehmendes Interesse u. a. für die Hydrolyse oder Synthese von Estern sowie Umesterungsreaktionen unter milden Bedingungen, wobei überwiegend hydrophobe Substrate eingesetzt werden (K. D. Mukherjee, *Biocatalysis* 1990, 3, 277—293; T. Nielsen, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 1985, 87, 15—19). Wegen der oft breiten Substratspezifität werden Lipasen nicht nur in der Fettchemie, sondern auch zunehmend für stereoselektive Reaktionen in der organischen Synthese verwendet. Ein wichtiger Faktor für die Wirtschaftlichkeit eines enzymatischen Prozesses ist die Entwicklung einer geeigneten Methode zur Immobilisierung des Biokatalysators, um die leichte Rückgewinnung und mehrfache Verwendbarkeit des Enzyms zu ermöglichen sowie wenn möglich eine Erhöhung seiner Stabilität unter den Reaktionsbedingungen zu erreichen. Der Stand der Technik auf diesem Gebiet der Enzymtechnologie ist in der Übersichtsli-  
teratur bereits mehrfach zusammengefaßt worden, u. a. für Lipasen (F. X. Malcata, H. R. Reyes, H. S. Garcia, C. G. Hill, Jr. und C. H. Amundson in *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1990, 67, 890—910). Dabei führt in manchen Fällen die Immobilisierung durch Einschluß der Lipase in eine feste Matrix, verglichen mit anderen Methoden, zu einer verbesserten Aktivitätsausbeute und Stabilität, ist jedoch meist aufwendiger in der Durchführung.

Die Herstellung von SiO<sub>2</sub>-Gelen nach dem Sol-Gel-Verfahren (C. J. Brinker, G. W. Scherer, *Sol-Gel-Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel-Processing*, Academic Press, San Diego 1990; L. L. Hench, J. K. West, *Chem. Rev.* 1990, 90, 33—72) durch Hydrolyse von Tetraalkoxysilanen wie Tetramethoxysilan oder Tetraethoxysilan läßt sich zum Einschluß von Biomolekülen in die anorganische Matrix verwenden. Zur Immobilisierung von Lipasen ist dieses Verfahren jedoch nicht geeignet, weil es nur sehr unbefriedigende Aktivitätsausbeuten liefert.

Überraschenderweise zeigt sich, daß der Einschluß von Lipasen in siliciumhaltigen Matrices, welche durch Hydrolyse von Alkoxysiliumverbindungen mit organischen Substituenten am Silicium in Gegenwart von geeigneten Katalysatoren sowie weiteren, im folgenden beschriebenen Zusätzen erhalten werden, zu Materialien mit ungewöhnlich hohen katalytischen Aktivitäten führt. Dabei werden durch die Immobilisierung nach unserer Methode für Reaktionen in organischen Medien unerwartete Steigerungen der Aktivität um bis zu zwei Größenordnungen im Vergleich zu der eingesetzten kommerziellen Enzympräparation beobachtet, sowie eine um mehr als zwei Größenordnungen erhöhte Aktivität im Vergleich zu Immobilisaten, die nach den o. g. konventionellen Sol-Gel-Verfahren (unter Verwendung von Tetraalkoxysilanen allein) hergestellt wurden. Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten immobilisierten Lipasen zeigen eine ausgezeichnete Stabilität einschließlich erhöhter Temperaturstabilität und sind breit anwendbar für Reaktionen sowohl in wäßrigen als auch in organischen Medien. Durch Variation der Immobilisierungsparameter lassen sich die Eigenschaften der Matrix und der erhaltenen Immobilisate gezielt steuern und ermöglichen damit einen breiten Spielraum zur Optimierung für eine gegebene technische Anwendung.

Gegenstand der Erfindung sind Lipase, welche in einer organische Substituenten enthaltenden Siliciumoxid-Matrix immobilisiert wurden, sowie das Verfahren zur Herstellung der derart immobilisierten Lipasen durch Hydrolyse von Siliciumverbindungen des Typs



und/oder



und/oder des Typs



in Gegenwart einer wäßrigen Lösung der Lipase, eventuell weiterer Lösungsmittel, eines (oder mehrerer) geeigneten Katalysators, eines oder mehrerer Additive mit positivem Einfluß auf Aktivität, Stabilität, mechanische oder magnetische Eigenschaften des erhaltenen immobilisierten Biokatalysators erhalten wird, wobei R und R'' ein gesättigter oder ungesättigter Alkylsubstituent mit 1 bis 18 C-Atomen oder ein aromatischer Substituent, R' ein Alkylrest mit 1—5 C-Atomen oder ein Alkalimetallatom, X ein bi- oder höherfunktioneller, Alkyl- oder Arylrest sowie ein Heteroatom, und Y—OH, —OR oder —Si(OR')<sub>3</sub> ist, k und l Zahlen zwischen 0 und 3 (mit k+l<4), m eine Zahl zwischen 2 und 4 (mit m+4—l—k), n eine Zahl zwischen 1 und 3, o eine Zahl zwischen 0 und 2 (mit o=3—n), p eine Zahl zwischen 2 und 4, r eine Zahl zwischen 2 und 4, q und r eine Zahl zwischen 0 und 2 mit q+r=2 und s eine Zahl zwischen 1 und 100 ist.

Vorzugsweise eingesetzte Siliciumkomponenten des Typs A, mit R' = Alkyl (z. B. Methyl, Ethyl) oder Natrium, sind:

— AI: Alkyl- oder Aryltrialkoxysilane RSi(OR')<sub>3</sub> mit P = Alkyl mit einer Kettenlänge von C1 bis C18, Alkenyl, z. B. Vinyl, oder Aryl, z. B. Phenyl,

— AII: Dialkyl-, Alkylaryl- oder Diarylalkoxysilane R<sub>k</sub>R''<sub>2-k</sub>Si(OR')<sub>2</sub> mit R, R'' = Alkyl mit einer Kettenlänge von C1 bis C18, z. B. Methyl, wobei Verbindungen des Typs AII (mit nur zwei zur Vernetzung geeigneten Gruppen) in Kombination mit Komponenten des Typs AI oder AIII, z. B. in einem Molverhältnis (AI, AIII) : AII

von 3—6 eingesetzt werden können,

— AIII: Tetraalkoxysilane  $\text{Si}(\text{OR}')_4$  in Kombination mit Silanen des Typs AI, AII, B oder C, wobei der Anteil der Siliciumatome mit einem oder mehreren organischen Substituenten mindestens 50 Atom-% bezogen auf die eingesetzte Gesamtmenge an Silicium beträgt.

Siliciumkomponenten des Typs B, mit  $\text{R}' = \text{Alkyl}$ , z. B. Methyl oder Ethyl, sind Bis(trialkoxysilyl)verbindungen der Formel  $(\text{R}'\text{O})_3\text{Si}-\text{X}-\text{Si}(\text{OR}')_3$  mit  $\text{X} = \text{Alkyl}$ , z. B.  $(\text{CH}_2)_2-6$ , Arylen oder  $\text{X} = \text{O}$  (Verwendung wie bei AIII in Kombination mit Silanen des Typs AI, AII, B oder C).

Siliciumkomponenten des Typs C werden in Kombination mit Verbindungen des Typs A, insbesondere AI und AIII, eingesetzt und sind oligomere oder polymere Dialkylsiloxane, insbesondere Polydimethylsiloxan, z. B. mit Silanolendgruppen und einer Kettenlänge von 5—60 monomeren Einheiten. Das Molverhältnis A : C der Komponenten beträgt dabei z. B. 3—6.

Die verwendeten Siliciumverbindungen des Typs A und/oder B können mit einem Teil des Wassers unter Zusatz von Säure oder einem der o. g. basischen Katalysatoren z. B. unter Einwirkung von Ultraschall vorbehandelt werden. Es können die Silane auch ohne Vorbehandlung direkt zur Enzymimmobilisierung eingesetzt werden.

Das in dieser Erfindung vorgestellte Verfahren ist breit anwendbar auf eine Reihe von Lipasen unterschiedlichster Herkunft. Die immobilisierten Lipasen können mikrobiellen Ursprungs sein, z. B. SP 523 Lipase (Novo), oder gewonnen aus Bakterien z. B. der Gattung *Pseudomonas* (z. B. *Ps. fluorescens*, *Ps. cepacia*), aus Hefen der Gattung *Candida* (z. B. *C. antarctica*, *C. lipolytica*), aus Schimmelpilzen der Gattungen *Rhizopus* (z. B. *Rh. arrhizus*, *Rh. delemar*, *Rh. niveus*), *Penicillium* (z. B. *P. roquefortii*), *Aspergillus* (z. B. *A. niger*), *Mucor* (z. B. *M. miehei*), pflanzlichen Ursprungs (z. B. aus Weizenkeim), sowie tierischen Ursprungs, z. B. aus Schweinepankreas. Eingesetzt werden 0.1—30 mg Lipase/mmol Siliciumverbindung(en). Bestimmungen des Proteingehaltes in Immobilisaten ohne zugesetztes Fremdprotein ergeben einen Immobilisierungsgrad von 10—>95% und die entsprechenden Beladungen betragen 0.2—80 mg immobilisiertes Lipaseprotein/g resultierendes Enzymimmobilisat.

Als Katalysator werden verwendet: basische Verbindungen, z. B. Ammonium- und Alkalimetallhydroxide, vorzugsweise Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid in einer Stöchiometrie von 10—100 mmol/mol Siliciumverbindung(en); Ammoniak in einer Stöchiometrie von 1—10 mmol/mol Siliciumverbindung(en); Ammonium- und Alkalimetallfluoride, vorzugsweise Natriumfluorid oder Kaliumfluorid in einer Stöchiometrie von 0.1—100, vorzugsweise 1—10 mmol/mol Siliciumverbindung(en); sowie Kombination dieser Verbindungen.

Als Additive werden eingesetzt: (I) Proteine (0—200 mg Protein/mg Lipase), z. B. Albumin, Gelatine, Natriumcaseinat; (II) Polyhydroxyverbindungen (0—1000 mg/mg Additiv/mg Lipase), z. B. Polyvinylalkohol (z. B. 0.05—200 mg/mg Lipase), Sorbitol, Glycerin, Polyethylenglykol (z. B. 0.5—1000 mg/mg Lipase); (III) unlösliche organische Polymere oder anorganische Verbindungen, z. B. Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), Materialien auf  $\text{SiO}_2$ -Basis, z. B. Celite®, offenporige Sintergläser wie z. B. Siran®, Controlled Porous Glass (CPG) oder Kieselgur; sowie Kombinationen dieser Verbindungen I—III. Art und Menge der zugesetzten Additive beeinflussen die erhaltene Aktivität der immobilisierten Lipase. Durch Zusatz geeigneter Additive lassen sich im Vergleich zu analogen Systemen ohne Additiv deutliche Steigerungen der Aktivitätsausbeute erzielen.

Wasser wird in Form von wäßrigen ungepufferten oder durch Zusatz geeigneter Puffersubstanzen gepufferter Lösungen der Lipase, der Additive, des Katalysators oder durch direkten Zusatz in das Reaktionsmedium eingebracht, in einer Stöchiometrie von 4—15, vorzugsweise 8—12 mol Wasser/mol Siliciumverbindung(en). Als Puffermedien sind z. B. Natrium- oder Kaliumphosphatpuffer, mit pH-Werten von 6—10 geeignet. Zum Reaktionsgemisch können organische Lösungsmittel wie z. B. aliphatische Alkohole (z. B. Methanol, Ethanol, Propanol), THF, DMF, in geringen Mengen bis 20 Vol.-% zugesetzt werden. Es kann auf die Zugabe organischer Lösungsmittel ganz verzichtet werden.

Eine bevorzugte Methode zur Immobilisierung von Lipasen besteht z. B. in der Zugabe einer gepufferten oder ungepufferten wäßrigen Lösung des Enzyms bei Temperaturen von 0°C—50°C, vorzugsweise bei 4°C bis Raumtemperatur, zu einem Gemisch aus Wasser oder wäßrigem Puffer, einer wäßrigen Lösung der o. g. Additive I und/oder II und einer wäßrigen Lösung des Katalysators, Mischen durch Schwenken oder Schütteln, Zugabe der Siliciumverbindungen (mit  $\text{R}' = \text{Alkyl}$ ), wobei bei Verwendung von Komponenten mit stark unterschiedlicher Reaktionsgeschwindigkeit wie z. B. Mischungen von Verbindungen des Typs AI und AIII die weniger reaktiven Komponenten zuerst hinzugefügt werden, Mischen bis zur Bildung einer homogenen Phase und Schwenken oder Schütteln bis zur Gelierung des Reaktionsgemisches. Bei Auftreten einer stärkeren Wärmeentwicklung beim Gelieren wird beim und unmittelbar nach dem Gelieren bei 0°C gekühlt. Die vollständig oder teilweise erstarrte Reaktionsmischung wird verschlossen stehengelassen, eventuell überstehende Flüssigkeit entfernt und die Produkte getrocknet. Die erhaltenen Produkte sind i. A. farblos und je nach den verwendeten Siliciumkomponenten spröde bis elastisch, harte glasartige Blöcke bis feine Pulver. Die erhaltenen Produkte können zerkleinert und in dieser Form insbesondere für Reaktionen in nichtwäßrigem Medium eingesetzt werden. Zur Verminderung der Gefahr unerwünschter Nebenreaktionen oder einer Kontamination durch überschüssigen Katalysator und Additive sowie zur Entfernung nur locker adsorbierter, nicht eingeschlossener Lipase, welche bei der Reaktion leichter ausgewaschen oder deaktiviert wird und damit zur Verminderung der Aktivität im Laufe des Katalysatoreinsatzes führt, wird allerdings ein Waschen des Enzymimmobilisates bevorzugt. Dazu werden die Immobilisate zerkleinert, mit Wasser oder wäßrigem Puffer (pH 6—8) geschüttelt, abfiltriert und mit Wasser sowie organischen Lösungsmitteln, vorzugsweise Aceton gefolgt von Pentan, nachgewaschen, getrocknet und abschließend gemahlen.

Die erhaltenen Materialien sind meist weiße Pulver mit spezifischen Oberflächen (BET-Methode) von ca. 0.1—700  $\text{m}^2/\text{g}$  und einem Porenvolumen von ca. 0.001—1  $\text{cm}^3/\text{g}$ .

In einer Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die zur Kondensation unter Gelbildung befähigten Si—OH-Gruppen nicht durch Hydrolyse von Si—O-Alkyl-Gruppen, sondern durch Protonierung von Si—O-Metallgruppen erzeugt. Dazu wird der pH-Wert einer wäßrigen Lösung eines Alkylsiliconates, z. B. Natriummethylsiliconat  $\text{MeSi}(\text{ONa})_3$ , durch Zugabe von Säuren, z. B. Salzsäure oder Essigsäure, auf pH 6—10 eingestellt und diese zu einem Gemisch aus Enzymlösung und weiteren o. g. Komponenten zugefügt. Zusätzlich können auch weitere Siliciumverbindungen der o. g. Typen A, B und/oder C mit  $\text{R}' = \text{Alkyl}$  zur Cokondensation in Kombination mit der in dieser Variante verwendeten Siliconatlösung eingesetzt werden.

In einer weiteren Variante wird die nach den o. g. Verfahren hergestellte Reaktionsmischung vor dem Gelieren in einem Überschuß von Wasser gegossen und unter starkem Rühren suspendiert. Nach dieser Methode erhält man das Enzymimmobilisat in Form annähernd sphärischer Partikel.

In einer weiteren Variante werden in das aus Silanen zusammen mit Enzymlösung und den weiteren o. g. Komponenten hergestellte Immobilisat als Additive des Typs III organische Polymere oder anorganische Materialien inkorporiert, beispielsweise Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) oder oxidische Materialien auf  $\text{SiO}_2$ -Basis, z. B. Celite®, offenporige Sintergläser wie z. B. Siran®, Controlled Porous Glass (CPG) oder Kieselgur. Dazu wird das Material entweder vor der Zugabe der Silane zum Reaktionsgemisch zugefügt oder aber nach Zugabe der Silane, aber vor Beginn der Gelierung zugegeben. Für das Aufbringen des Enzymimmobilisates auf große, offenporige Partikel wird das Reaktionsgemisch vor Beginn der Gelierung auf den Träger aufgebracht. Die Verwendung derartiger oxidischer Zusätze führt zu positiven Eigenschaften des Immobilisates, z. B. bezüglich der leichteren Abtrennung des immobilisierten Katalysators durch Einführung von magnetischen Eigenschaften im Falle von Magnetit bzw. für den Einsatz im kontinuierlichen Durchflußbetrieb durch die Erzeugung eines grobkörnigen Materials im Falle porösen  $\text{SiO}_2$ -Trägern wie Siran®. Die katalytische Aktivität des Immobilisates im Vergleich zu analogem Material ohne zugesetztes anorganisches Material zeigt i. A. keine Beeinträchtigung, oder sogar einen positiven Einfluß auf die Aktivität.

Die nach dem in dieser Erfindung beschriebenen Verfahren erhaltenen Enzymimmobilisate weisen eine hohe Aktivität bei Veresterungs- und Umesterungsreaktionen in organischem Medium auf und sind i. A. um einen Faktor von 2—>120 aktiver als die gleiche Menge der zur Immobilisierung eingesetzten kommerziellen Enzympräparate. Für Reaktionen in wäßrigem Medium wie z. B. die Hydrolyse von Olivenölemulsionen werden beispielsweise für *Ps. cepacia* Lipase Aktivitätsausbeuten bis 62%, bezogen auf die zur Immobilisierung eingesetzte Lipasemenge, erhalten.

Das Enzymimmobilisat zeigt hohe Stabilität in Wasser, organischem Medium oder bei der Lagerung in trockenem Zustand auch bei erhöhten Temperaturen. So wird bei dreimonatiger Lagerung beispielsweise einer nach dem erfindungsgemäßen Verfahren immobilisierten *Ps. cepacia* Lipase bei Raumtemperatur praktisch kein Aktivitätsverlust (weniger als 5%) beobachtet.

## I. Beispiele

### Beispiel 1

#### Immobilisierung von *Ps. cepacia* Lipase

Lipase (Amano PS) wird in dest. Wasser suspendiert (25 mg/ml), 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand zur Immobilisierung eingesetzt. In einem 2-ml-Polypropylengefäß werden 0,58 ml Wasser, 0,2 ml wäßrige Polyvinylalkohollösung (MG 15000, Fluka, 4% w/v), 0,1 ml 1 M NaF-Lösung, sowie 0,2 ml der wäßrigen Enzymlösung (enthält 0,46 mg gelöstes Protein, entsprechend 5,0 mg kommerzieller Amano PS Lipase) gemischt und mit 0,857 ml Methyltrimethoxysilan (6 mmol, mit mol Silan/mol Wasser (gesamt) = 1 : 10) versetzt. Das zweiphasige Gemisch wird auf einem Vortex-Schüttler 30 s intensiv gemischt. Nach ca. 30 s geht die die trübe Emulsion unter Wärmeentwicklung in eine klare homogene Lösung über und wird bei 0°C gekühlt, bis nach kurzer Zeit die gesamte Reaktionsmischung zu einem homogenen milchig-trüben Festkörper erstarrt. Dieser wird 24 h bei Raumtemperatur verschlossen stehengelassen, 3 d bei 30°C unter Normaldruck getrocknet und gemörsert. Das Rohprodukt wird mit 10 ml Wasser 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt (350 U/min), über eine Glasfritte (D4) abfiltriert und mit 20 ml Wasser, gefolgt von zweimal 20 ml Aceton sowie 20 ml Pentan gewaschen. Das Immobilisat wird 24 h bei 30°C getrocknet und gemahlen (Kugelmühle). Auswaage: 0,38 g.

mg eingesetzte gelöste Amano PS-Lipase/g Immobilisat: 1,2

Aktivitätsfaktor [(Aktivität des Immobilisats)/(Aktivität der freien Lipase) = 0,55%

Umsatz/h · mg kommerzielle Lipase, Aktivitätstest 1, s. S. 18]: 6,3

### Beispiel 2

#### Immobilisierung von *Ps. cepacia* Lipase in Gelen des Typs AI, AI/AI', AI/AII, AI/C und B

*Ps. cepacia* Lipase (Amano PS) wird in dest. Wasser suspendiert (25 mg/ml), 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand zur Immobilisierung eingesetzt. In einem 2-ml-Polypropylengefäß werden Wasser (so daß ein Verhältnis von mol Wasser (gesamt)/mol Silan(e) von 8 : 1 erhalten wird), 0,2 ml wäßrige Polyvinylalkohollösung (4% w/v, MG 15000, Fluka), 0,1 ml 1 M NaF-Lösung, sowie 0,2 ml der wäßrigen Enzymlösung (enthält 0,46 mg gelöstes Protein, entsprechend 5,0 mg kommerzieller Amano PS Lipase) gemischt und mit der in der Tabelle angegebenen Menge der Siliciumverbindungen I und II versetzt. Das zweiphasige

Gemisch wird auf einem Vortex-Schüttler 30 s intensiv gemischt und anschließend bei 1200 U/min und Raumtemperatur geschüttelt. Nach ca. 30 s bis 3 h setzt, i. A. unter Wärmeentwicklung, der Geliervorgang ein. Es wird bei 0°C gekühlt, bis nach kurzer Zeit die Reaktionsmischung teilweise oder vollständig zu einem milchig-trüben Festkörper erstarrt, der wie in Beispiel 1 beschrieben weiterbehandelt wird.

	Silan I	Silan II	mmol I	mmol II	Auswaage (g)	mg Lipase/ g Gel <sup>[a]</sup>	Aktivitäts- faktor <sup>[b]</sup>	Aktiv. (%) <sup>[c]</sup>	Immob. grad <sup>[d]</sup>	
a	MTMS	—	6.0	—	0.39	1.2	4.6	6.8	0.36	10
b	MTMS	ETMS	3.0	3.0	0.44	1.1	2.4	n. b.	0.45	
c	MTMS	DMDDES	4.5	0.75	0.31	1.5	4.2	9.7	n. b.	
d	MTMS	DMDES	3.0	1.5	0.31	1.5	3.7	n. b.	n. b.	
e	MTMS	PDMS <sup>[c]</sup>	4.5	0.75	0.49	0.9	3.4	19	0.75	
f	MTMS	PDMS <sup>[e]</sup>	3.0	0.75	0.30	0.15	6.3	27	0.33	15
g	MTMS	PDMS <sup>[c]</sup>	3.0	1.0	0.228	0.17	7.5	n. b.	0.19	
h	MTMS	PDMS <sup>[f]</sup>	4.0	0.043	0.24	1.9	4.6	n. b.	0.39	
i	BTMSE	—	4.0	—	0.80	0.6	1.0	n. b.	n. b.	
j	VTMS	—	6.0	—	0.41	1.1	7.7	14	n. b.	

[a] mg eingesetztes Enzymprotein/g Immobilisat;

[b] Aktivitätstest 1 (s. S. 18), (Aktivität des Immobilisats)/(Aktivität der freien Lipase);

[c] Test 2 (s. S. 18);

[d] (Menge an immobilisiertem Protein = eingesetzte Proteinmenge — Proteinmenge in den Waschflüssigkeiten)/(Menge an zur Immobilisierung eingesetztem Protein), BCA-Protein-Assay, Fa. Pierce, BSA-Standard;

[e] M.G. 400—700;

[f] M.G. 4200; n. b. = nicht bestimmt;

verwendete Abkürzungen:

MTMS: Methyltrimethoxysilan (Fluka), ETMS: Ethyltrimethoxysilan (ABCR), VTMS: Vinyltrimethoxysilan (Fluka), PDMS: Polydimethylsiloxan m. Silanolendgruppen (ABCR), DMDDES: Dimethyldiethoxysilan (Fluka), BTMSE Bis(trimethoxysilyl)ethan (ABCR)

Stabilität der Enzymimmobilisate am Beispiel der Immobilisate 2a und 2g:

- Restaktivität nach dreimonatiger Lagerung bei Raumtemperatur: > 95%
- Restaktivität nach dreimonatiger Lagerung in 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.0 bei Raumtemperatur: 31% (2a), 18% (2g)
- Restaktivität nach 30 Reaktionscyclen zu je 22 h bei 30°C (batch-Verfahren, Veresterung von Laurinsäure mit 1-Octanol in 2,2,4-Trimethylpentan, siehe Aktivitätstest I, mit Waschen des Immobilisates nach jedem Cyclus): > 80% (2a, 2g)
- Restaktivität nach Lagerung in 1-Octanol, 28 d bei 70°C: 65% (2g)

### Beispiel 3

#### Immobilisierung von *Ps. cepacia* Lipase in Gelen des Typs AI/AIII, B/AIII, C/AIII

Wie in Beispiel 2, nur daß die zweite Siliciumverbindung (II) in allen Fällen Tetramethoxysilan (TMOS) ist.

In allen Fällen werden Wasser (so daß das in der Tabelle angegebene Verhältnis R = mol Wasser (gesamt)/mol Silan(e) erhalten wird) 0.2 ml wäßrige Polyvinylalkohollösung (MG 15000, Fluka, 4% w/v), 0.1 ml 1 M NaF-Lösung, sowie 0.4 ml der wäßrigen Enzymlösung (enthält 0.46 mg gelöstes Protein, entsprechend 5.0 mg kommerzieller Amano PS Lipase) gemischt und mit der in der Tabelle angegebenen Menge der Siliciumverbindung I und II (TMOS) versetzt. Das zweiphasige Gemisch wird auf einem Vortex-Schüttler 30 s (oder bei Mischungen, die schneller gelieren, bis zur Gelierung) intensiv gemischt und anschließend bei 1200 U/min und Raumtemperatur geschüttelt. Nach ca. 2 s bis 3 h setzt, i. A. unter Wärmeentwicklung, der Geliervorgang ein und es wird 1—2 min bei 0°C gekühlt. Die weitere Behandlung des Immobilisates erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben.

	Silan I	mmol I	mmol TMOS	R	Auswaage (g)	mg Lipase/ g Gel <sup>[a]</sup>	Aktivitäts- faktor <sup>[b]</sup>	Aktiv. (%) <sup>[c]</sup>	Immob. grad <sup>[d]</sup>
5	a ETMS	5.0	1.0	8.0	0.46	1.0	4.5	35	0.49
	b PTMS	3.0	3.0	8.0	0.48	1.0	1.7	15	0.73
	c PTMS	5.0	1.0	8.0	0.46	1.0	6.7	21	0.43
	d OTMS	1.5	1.5	9.3	0.32	1.4	2.4	n. b.	0.55
	e ODTMS	1.5	1.5	9.3	0.46	1.0	2.5	14	0.50
10	f PDMS <sup>[e]</sup>	0.75	4.5	8.0	0.44	1.0	2.0	16	0.53
	g PDMS <sup>[e]</sup>	0.75	3.0	8.0	0.29	1.6	5.8	62	0.19
	h PDMS <sup>[e]</sup>	1.0	3.0	8.0	0.27	1.7	6.2	40	0.11
	i BTMSH	3.0	0.5	8.0	0.80	0.6	1.0	n. b.	n. b.
	j PhTMS	4.5	1.5	8.0	0.29	1.6	1.8	n. b.	n. b.
15	k PhTMS	5.0	1.0	8.0	0.22	2.1	2.2	n. b.	n. b.
	l —	—	6.0	8.0	0.49	0.9	0.03	2.3	63

[a] mg eingesetztes Enzymprotein/g Immobilisat,

[b] Test 1, (Aktivität des Immobilisats)/(Aktivität der kommerziellen Lipase),

[c] Test 2,

20 [d] (Menge an immobilisiertem Protein)/(Menge an zur Immobilisierung eingesetztem Protein),

[e] M.G. 400—700

verwendete Abkürzungen:

25 MTMS: Methyltrimethoxysilan (Fluka), ETMS: Ethyltrimethoxysilan (ABCR), PTMS: Propyltrimethoxysilan (Aldrich), OTMS: Octyltrimethoxysilan (ABCR), ODTMS: Octadecyltrimethoxysilan (ABCR), PhTMS: Phenyltrimethoxysilan (Fluka), VTMS: Vinyltrimethoxysilan (Fluka), PDMS: Polydimethylsiloxan m. Silanolendgruppen (ABCR), BTMSH: Bis(trimethoxysilyl)hexan (ABCR)

#### Beispiel 4

#### 30 Immobilisierung verschiedener Lipasen in Gelen auf Methyltrimethoxysilanbasis

Durchführung wie in Beispiel 2a, nur daß anstelle von Amano PS Lipase verschiedene Lipasen unterschiedlicher Herkunft (jeweils die in der Tabelle angegebenen Menge an kommerzieller Lipase in 0.2 ml 0.1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7.5, nach Abzentrifugieren von unlöslichen Bestandteilen) eingesetzt werden.

35 Gelierzeit 0.5—2 min

Herkunft der Lipase <sup>[a]</sup>	U/mg Protein <sup>[b]</sup>	mg Lipase <sup>[c]</sup>	mg lösl. Lipaseprot.	% Umsatz/h · mg <sup>[h]</sup>	Auswaage in g	mg Lipase/g Gel <sup>[d]</sup>	Aktivitätsfaktor <sup>[e]</sup>	Immob. grad <sup>[f]</sup>
a Rhizopus arrhizus	1.5	35	9.1	0.10	0.39	23.3	1.6	16
b Rhizopus delemar	45.6	5.0	2.8	0.1	0.39	7.2	0.4	35
c Rhizopus niveus	2.6	35	7.8	0.02	0.41	19.0	0.6	34
d Mucor Miebei	24.2	10	6.4	0.07	0.40	16.0	0.5	34
e Penicillium roqueforti	1.9	10	2.8	0.07	0.38	7.4	2.8	n. b.
f Candida lipolytica	3.0	35	3.2	0.33	0.37	8.6	1.4	38
g Novo SP 523 <sup>[g]</sup>	k. A.	10	7.6	0.13	0.38	20.0	12.4	24
h Weizenkeim	0.12	35	21.3	0.01	0.39	54.6	1.3	56

<sup>[a]</sup> Bezugsquelle: Fluka (a, b, c, d, e, f, h), Novo (i);

<sup>[b]</sup> Spezifikation des Herstellers (k. A. = keine Angabe);

<sup>[c]</sup> zur Immobilisierung eingesetzte kommerzielle Lipase;

<sup>[d]</sup> mg eingesetztes lösliches Enzymprotein/g Immobilisat;

<sup>[e]</sup> Test 1, (Aktivität des Immobilisats)/(Aktivität der kommerziellen Lipase);

<sup>[f]</sup> (Menge an immobilisiertem Protein)/(Menge an zur Immobilisierung eingesetztem löslichem Protein);

<sup>[g]</sup> rekombinantes Enzym unbekannten mikrobiellen Ursprungs,

<sup>[h]</sup> Anfangsgeschwindigkeit (% Umsatz/h · mg kommerzielle Lipase), Aktivitätstest 1

## Stabilität der Enzymimmobilisate am Beispiel des Immobilisates 4d:

— Restaktivität nach dreimonatiger Lagerung in 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.0 bei Raumtemperatur: 70%

## Beispiel 5

## Immobilisierung verschiedener Lipasen in Gelen auf Methyltrimethoxysilan/Polydimethylsiloxanbasis

Durchführung wie in Beispiel 2e, nur daß anstelle von Amano PS Lipase verschiedene Lipasen unterschiedlicher Herkunft (jeweils die in der Tabelle angegebenen Menge an kommerzieller Lipase in 0.2 ml 0.1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7.5, nach Abzentrifugieren von unlöslichen Bestandteilen) eingesetzt werden.  
Gelierzzeit: 1—5 min

	Herkunft der Lipase <sup>[a]</sup>	mg Lipase <sup>[b]</sup>	mg, lösl. Lipaseprot.	Auswaage (g)	mg Lipase g Gel <sup>[c]</sup>	Aktivitätsfaktor <sup>[d]</sup>	Immob. grad <sup>[e]</sup>
15	a Rhizopus arrhizus	35	9.1	0.39	23.3	4.2	20
	b Rhizopus delemar	5.0	2.8	0.36	1.4	0.8	59
20	c Rhizopus niveus	35	7.8	0.32	24.4	1.4	28
	d Mucor Miebei	10	6.4	0.33	19.4	1.9	n. b.
	e Penicillium roqueforti	10	2.8	0.37	7.6	3.3	n. b.
	f Aspergillus niger	10	9.1	0.39	23.3	21.2	88
25	g Candida lipolytica	35	3.2	0.36	8.9	1.9	66
	h Novo SP 523	10	7.6	0.35	21.7	19.1	88
	i Weizenkeim	35	21.3	0.33	64.5	2.1	42

[a] Bezugsquellen und spez. Aktivität vgl. Beispiel 4;

[b] eingesetzte kommerzielle Lipase;

[c] mg eingesetztes lösliches Enzymprotein/g Immobilisat;

[d] Test 1, (Aktivität des Immobilisats)/Aktivität der kommerziellen Lipase);

[e] (Menge an immobilisiertem Protein)/(Menge an zur Immobilisierung eingesetztem löslichem Protein)

## Stabilität der Enzymimmobilisate am Beispiel des Immobilisates 5d:

— Restaktivität nach dreimonatiger Lagerung in 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.0 bei Raumtemperatur: 92%

## Beispiel 6

## Immobilisierung verschiedener Lipasen in Gelen auf Propyltrimethoxysilan/Tetramethoxysilanbasis

Durchführung wie in Beispiel 3c, nur daß anstelle von Amano PS Lipase verschiedene Lipasen unterschiedlicher Herkunft (jeweils die in der Tabelle angegebenen Menge an kommerzielle Lipase in 0.2 ml 0.1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7.5, nach Abzentrifugieren von unlöslichen Bestandteilen) eingesetzt werden.  
Gelierzzeit: 0.5—2 min

	Herkunft der Lipase <sup>[a]</sup>	mg Lipase <sup>[b]</sup>	mg, lösl. Lipaseprot.	Auswaage (g)	mg Lipase/ g Gel <sup>[c]</sup>	Aktivitätsfaktor <sup>[d]</sup>	Immob. grad <sup>[e]</sup>
50	a Rhizopus arrhizus	35	9.1	0.46	19.8	4.0	44
	b Rhizopus delemar	5.0	2.8	0.48	5.8	0.5	91
	c Rhizopus niveus	35	7.8	0.45	17.3	1.2	59
	d Mucor Miebei	10	6.4	0.48	13.3	4.4	83
55	e Penicillium roqueforti	10	2.8	0.49	5.7	10.9	n. b.
	f Aspergillus niger	10	9.1	0.48	18.9	18.9	95
	g Candida antarctica <sup>[f]</sup>	5	1.3	0.41	2.7	2.3	30
	h Candida lipolytica	35	3.2	0.49	6.5	0.9	70
	i Novo SP 523	10	7.6	0.46	16.5	81.2	96
60	j Weizenkeim	35	21.3	0.45	47.3	6.8	81
	k Schweinepankreas <sup>[g]</sup>	35	4.0	0.49	8.2	1.1	55

[a] Bezugsquellen und spez. Aktivität vgl. Beispiel 4;

[b] eingesetzte kommerzielle Lipase;

[c] mg eingesetztes lösliches Enzymprotein/g Immobilisat;

[d] Test 1, (Aktivität des Immobilisats)/(Aktivität der kommerziellen Lipase);

[e] (Menge an immobilisiertem Protein)/(Menge an zur Immobilisierung eingesetztem löslichem Protein);

[f] Fluka, 3.3 U/mg Protein, 0.83% Umsatz/h · mg kommerzielle Lipase, Aktivitätstest 1;

[g] Fluka, 50 U/mg Protein, 0.16% Umsatz/h · mg kommerzielle Lipase, Aktivitätstest 1



## Beispiel 7

Immobilisierung von *Pseudomonas cepacia* Lipase

Verfahren wie in Beispiel 2a, nur daß anstelle von 0.1 ml einer 1 M NaF-Lösung die unten angegebenen Katalysatoren und Wassermengen (bei konstantem Wert von  $R=8$ ) verwendet wurden. Die Gelierzeit betrug 0.5–1 min (7a), 24 h (7b, 7c), 48 h (7d).

Auswaagen 0.34–0.42 g

mg eingesetzte gelöste Amano PS-Lipase/g Immobilisat: 1.1–1.3

	Katalysator	ml Wasser	Aktivitätsfaktor [Test 1]
a	0.1 ml Ammoniumfluorid (1 M)	0.364	3.2
b	0.1 ml Natriumhydroxid (1 M)	0.364	7.0
c	0.01 ml Natriumhydroxid (1 M)	0.454	8.5
d	0.1 ml Ammoniaklösung (1 M)	0.364	8.9

## Beispiel 8

Immobilisierung von *Ps. cepacia* Lipase

Wie Beispiel 2a, nur daß unterschiedliche Additive und Wassermengen (bei konstantem Verhältnis  $R$  von Wasser zu Silan = 8 : 1) wie in der Tabelle angegeben verwendet wurden.

Auswaagen 0.38–0.4 g

mg eingesetzte gelöste Amano PS-Lipase/g Immobilisat: 1.1–1.2

	Additiv	ml Wasser	Aktivitätsfaktor [Test 1]
a	0.2 ml Polyethylenglykol 6000 (Fluka, 20% w/w in Wasser)	0.364	4.7
b	0.2 ml Rinderserumalbumin (Sigma, 50 mg/ml in Wasser)	0.364	5.4
c	0.1 ml Gelatine (ICN, 4% w/v in Wasser)	0.464	3.5
d	0.2 ml Sorbitol (Merck, 100 mg/ml)	0.364	1.6
e	0.2 ml Glycerin (Henkel)	0.564	1.7
f	kein Additiv	0.564	1.2

## Beispiel 9

## Immobilisierung von Novo SP 523 Lipase

Lipase SP 523 (Novo) wird in dest. Wasser suspendiert (50 mg/ml), 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand zur Immobilisierung eingesetzt. In einem 2-ml-Polypropylengefäß (Fa. Eppendorf) werden 42 µl Wasser, 0.1 ml wäßrige Polyvinylalkohollösung (MG 15000, Fluka, 4% w/v), 14 µl 1 M NaF-Lösung, sowie 0.1 ml der wäßrigen Enzymlösung (enthält 2.06 mg gelöstes Protein, entsprechend 5.0 mg kommerzieller SP 523 Lipase) gemischt und mit 0.217 ml PDMS (0.4 mmol, MG 400–700, ABCR) sowie 0.221 ml Tetramethoxysilan (1.5 mmol, Fluka) versetzt. Das zweiphasige Gemisch wird auf einem Vortex-Schüttler 2 s intensiv gemischt, mit 1.2 g Siran® (Fa. Schott, 16 h bei 60°C vorbehandelt mit 1 N HCl, mit Wasser gewaschen, eingesetzt mit einem Wassergehalt von 30%) versetzt, bis zum Gelieren ca. 5 s auf dem Vortex-Schüttler gemischt und bei 0°C 2 min gekühlt. Das Produkt wird wie in Beispiel 1 beschrieben getrocknet und gewaschen, die mit dem Immobilisat imprägnierten Siranpartikel werden jedoch nicht zerkleinert.

Auswaage: 0.94 g

Beladung (SP 523-Lipase, mg eingesetztes gelöstes Protein/g Immobilisat): 2.2

Aktivitätsausbeute [Test 1]: 112

[Aktivität (Gel mit Siran)]/[Aktivität (gleiche Menge Bulk-Gel o. Siran)]: 1.9

% immobilisiertes Protein (aus Proteinbestimmung der Waschflüssigkeiten): 98

## Beispiel 10

Immobilisierung von *Pseudomonas cepacia* Lipase in Magnetit-haltigen Trägern

*Ps. cepacia* Lipase (Amano PS) wird in dest. Wasser suspendiert (25 mg/ml), 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand zur Immobilisierung eingesetzt. In einem 2-ml-Polypropylengefäß (Fa. Eppendorf) werden 0.2 ml wäßrige Gelatinelösung (4% w/v, ICN), 0.1 ml 1 M NaF-Lösung, sowie 0.2 ml der wäßrigen Enzymlösung (enthält 0.46 mg gelöstes Protein, entsprechend 5.0 mg kommerzieller Amano PS Lipase) gemischt und mit 0.5 g Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , frisch hergestellt nach Kobayashi et al., J. Coll. Interface Sci. 1991, 141, 505, Wassergehalt 70%) versetzt und auf einem Vortex-Schüttler 2 s intensiv gemischt. Es werden 0.857 ml (6 mmol) MTMS zugegeben und das Reaktionsgemisch wird auf einem Vortex-Schüttler bis zur Gelierung nach

0.5—1 min intensiv gemischt und anschließend bei 1 min bei 0°C gekühlt. Die weitere Behandlung des Gels erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben, nur daß anstelle von Filtrationsvorgängen Dekantierungen unter Zuhilfenahme eines Permanentmagneten vorgenommen wurden.

Auswaage: 0.47 g

- 5 mg eingesetzte gelöste Lipase/g Immobilisat: 1.0  
Aktivitätsfaktor [Test 1]: 2.2

### Beispiel 11

#### Immobilisierung von Lipasen in Gelen aus Natriummethylsiliconat

Die in der Tabelle angegebene Menge an kommerzieller Lipase wird in 1 ml 0.1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7.0, suspendiert, 15 min geschüttelt und durch Zentrifugation von festen Rückständen befreit. Unmittelbar vor der Immobilisierung werden 4 ml Natrium-Methylsiliconat-Lösung (30% in Wasser, 7.5 mmol, ABCR) unter starkem Rühren mit 0.65 ml konz. HCl versetzt, so daß ein pH-Wert von pH 8.0—8.5 resultiert. Zu einer Mischung aus 0.25 ml Enzymlösung, 0.25 ml Aluminiumlösung (50 mg/ml Rinderserumalbumin, Sigma), 0.1 ml 1 M Natriumfluoridlösung und 0.5 ml 1 M Na-Phosphatpuffer pH 7.0 werden 0.5 ml Polydimethylsiloxan (0.9 mmol, MG 400—700, ABCR) sowie anschließend 0.5 ml der Natriumsiliconatlösung (entsprechend 0.8 mmol) zugegeben und auf einem Vortexschüttler bis zur Gelierung, ca. 1—2 s, gründlich durchmischt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

	Herkunft der Lipase <sup>[a]</sup>	mg Lipase <sup>[b]</sup>	mg, lösl. Lipaseprot.	Auswaage (g)	mg Lipase/ g Gel <sup>[c]</sup>	Aktivitäts- faktor <sup>[d]</sup>	Immob. grad <sup>[e]</sup>
25	a Pseudomonas fluorescens	5.0	1.3	0.15	8.7	0.8	54
	b Pseudomonas cepacia	5.0	0.5	0.15	3.2	1.2	23
	c Rhizopus arrhizus	20	5.2	0.14	37.3	1.7	36
	d Rhizopus delemar	2.5	1.4	0.21	6.8	2.0	43
30	e Rhizopus niveus	20	4.5	0.14	32.4	5.2	80
	f Mucor Miebei	5	3.2	0.13	25.2	6.2	77
	g Penicillium roqueforti	5	1.4	0.16	8.7	5.0	62
	h Aspergillus niger	5	4.6	0.14	3.2	2.4	71
	i Candida antarctica	5	1.3	0.17	7.2	0.8	51
35	j Candida lipolytica	20	2.1	0.17	13.4	3.7	60
	k Novo SP 523	5	3.8	0.17	22.6	128	n. b.
	l Weizenkeim	10	6.1	0.14	43.4	2.9	82

<sup>[a]</sup> Bezugsquellen und spez. Aktivität vgl. Beispiel 5, Ps. fluorescens Lipase: Fluka, 31.5 U/mg Protein;

<sup>[b]</sup> eingesetzte kommerzielle Lipase;

40 <sup>[c]</sup> mg eingesetztes lösliches Enzymprotein/g Immobilisat;

<sup>[d]</sup> Test 1, (Aktivität des Immobilisats)/(Aktivität der kommerziellen Lipase);

<sup>[e]</sup> (Menge an immobilisiertem Protein)/(Menge an zur Immobilisierung eingesetztem löslichem Protein);

<sup>[f]</sup> % Umsatz/h (Anfangsgeschwindigkeit) für die kommerzielle Lipase

### Beispiel 12

#### Immobilisierung von Novo SP 523 Lipase

50 50 mg SP 523 Lipase (Novo) werden in 1 ml 0.1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7.0, suspendiert, 15 min geschüttelt und durch Zentrifugation von festen Rückständen befreit. Es werden 0.1 ml Enzymlösung (entsprechend 5 mg kommerzieller Lipase, 3.8 mg gelöstem Protein), 0.2 ml 1 M Na-Phosphatpuffer pH 7.0, 0.1 ml Polyvinylalkohol (M.G. 15000, 4% in Wasser) und 0.04 ml 1 M Natriumfluoridlösung gemischt, mit 0.2 ml Polydimethylsiloxan (0.36 mmol, MG 400—700, ABCR) sowie anschließend mit 0.2 ml Natriummethylsiliconat-Lösung (30% in Wasser, 0.38 mmol, ABCR) und 0.03 ml konz. Salzsäure versetzt, ca. 1 s gemischt (Vortexschüttler) und mit 1 g Siran® (Fa. Schott) intensiv gemischt. Das Produkt wird wie in Beispiel 1 beschrieben getrocknet und gewaschen, die mit dem Immobilisat imprägnierten Siranpartikel werden jedoch nicht zerkleinert.

Auswaage: 1.2 g

Beladung (Lipase, mg eingesetztes gelöstes Protein/g Immobilisat): 3.1

60 Aktivitätsfaktor [Test 1]: 1187

[Aktivität (Gel mit Siran)]/[Aktivität (gleiche Menge Bulk-Gel o. Siran)]: 1.4

% immobilisiertes Protein (aus Proteinbestimmung der Waschflüssigkeiten): 96

## II. Aktivitätstests und Reaktionen unter Verwendung immobilisierter Lipasen

65

### (1) Veresterung von Laurinsäure mit 1-Octanol

Das Enzymimmobilisat (100—1000 mg je nach Beladung) werden in einem 50 ml Zentrifugenbecher (Polypro-

pylen, mit Schraubverschluß) mit einer Mischung von 100 mg Laurinsäure (0.5 mmol, Fluka), 0.158 ml 1-Octanol (1 mmol, Merck) und 2,2,4-Trimethylpentan (ad 10 ml, Aldrich) versetzt, verschlossen und in einem Wasserbad bei 30°C und 180 U/min geschüttelt. Zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit werden in regelmäßigen Abständen Proben (0.15 ml) abgenommen und das Verhältnis von Laurinsäureoctylester zu Laurinsäure gaschromatographisch bestimmt (0.25 mm FFAP-Kapillarsäure, 15 m). Zur Bestimmung des Aktivitätsfaktors wird die derart ermittelte Reaktionsgeschwindigkeit dividiert durch die Reaktionsgeschwindigkeit, die unter gleichen Bedingungen mit einer Menge an kommerziellen Enzympräparat erhalten wird, welche der zur Immobilisierung eingesetzten Menge gleich ist.

## (2) Hydrolyse von Olivenölemulsionen

20 ml einer Lösung von Gummi arabicum, (Sigma, 100 g/l in Wasser) werden 6.5 ml Olivenöl (Sigma, filtriert über Aluminiumoxid B, Aktivitätsstufe I) gegeben und die Mischung mit einem Mixer 30 min homogenisiert. Zu 25 ml der Substratemulsion werden 20 ml 0.1 M Na-Phosphatpuffer, pH 9, zugegeben, der pH-Wert mit 0.1 M NaOH auf 8.0 eingestellt und es wird 2 min homogenisiert. In einem 2-ml-Eppendorfgefäß werden 10 mg des Enzymimmobilisates 5 min mit 0.1 ml Wasser geschüttelt, mit 0.9 ml der gepufferten Substratemulsion versetzt, auf einem Vortexschüttler 5 s intensiv gemischt und bei 30°C und 1200 U/min 0.5–2 h geschüttelt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0.1 ml einer Lösung von konz. Schwefelsäure (1 ml) in Hexan/i-Propanol 1 : 5 (10 ml) beendet, und das Reaktionsgemisch mit 0.6 ml Hexan extrahiert. 0.4 ml der Hexanphase werden mit 1 ml Aceton/Ethanol 1 : 1 sowie Phenolphthalein versetzt und die freie Fettsäure mit 0.1 M ethanolischer Kaliumhydroxidlösung titriert. Die Aktivitätsausbeute wird ermittelt durch Vergleich der erhaltenen Umsätze mit dem Umsatz, der unter identischen Reaktionsbedingungen mit einer Lösung der freien Lipase erreicht wird, und in Prozent angegeben.

## (3) stereoselektive Veresterungen racemischer sekundärer Alkohole am Beispiel der Veresterung von 1-Phenylethanol mit Acetanhydrid und immobilisierter Ps. cepacia Lipase

Das Enzymimmobilisat (immobilisiert nach Beispiel 2e, Menge je nach Beladung) wird in 4 ml Benzol suspendiert, mit 2.4 µmol Acetanhydrid sowie 2.4 µmol des racemischen 1-Phenylethanol versetzt und bei Raumtemperatur und 400 U/min geschüttelt. Zum Verfolgen der Reaktion werden in regelmäßigen Abständen Proben (0.15 ml) entnommen, mit 0.15 ml 5%iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung ausgeschüttelt und nach Zentrifugation die organische Phase gaschromatographisch untersucht. Der Enantiomerenüberschuß nach beendeter Reaktion wurde gaschromatographisch (0.25 mm Kapillare, 30 m, Säulenmaterial: 6-t-Butyldimethylsilyl-2,3-dimethyl-β-cyclodextrin, 20% in UV 1701) bestimmt:

Umsatz: 50%;

%ee (Ester): > 99

%ee (Alkohol): > 99

## (4) Umesterung von Olivenöl mit Palmitinsäure am Beispiel immobilisierter Novo SP 523 Lipase

0.2 g Palmitinsäure werden in der Wärme in 1.5 ml 2,2,4-Trimethylpentan gelöst, mit 0.2 ml Triolein (Sigma) gemischt und das Enzymimmobilisat (Novo SP 523 Lipase, immobilisiert gemäß Beispiel 12, Wassergehalt 16%, 58 mg, entsprechend 0.15 mg des zur Immobilisierung eingesetzten löslichen Lipaseproteins) wird zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei 40°C und 1200 U/min geschüttelt. In regelmäßigen Abständen werden Proben (0.05 ml) abgenommen und der Umsatz gaschromatographisch verfolgt (nach Silylierung mit BSTFA/TMCS (99 : 1)/Pyridin; Kapillarsäure mit PS048-Phase). Die Aktivität (definiert als Verbrauch an Palmitinsäure von 1 U = 1 µmol/min) beträgt 0.56 U, entsprechend 11.28 U/g Immobilisat.

## (5) Hydrolyse von Olivenöl am Beispiel immobilisierter Ps. cepacia Lipase

Immobilisierte Ps. cepacia Lipase (Immobilisierungsmethode wie oben beschrieben bei z. T. abweichender eingesetzter Enzymmenge; Menge nach Beladung, entsprechend 0.12 mg zur Immobilisierung eingesetztem gelöstem Lipaseprotein) wird mit 10 ml Wasser sowie 10 ml Olivenöl gemischt und bei 40°C und 230 min<sup>-1</sup> geschüttelt (50 ml Polypropylengefäß mit Schraubverschluß, 2.7 cm Durchmesser). In regelmäßigen Zeitabständen werden Proben der Ölphase (0.15 ml) entnommen, mit Aceton/Ethanol 1 : 1 (1 ml) und Phenolphthalein versetzt und die freigesetzte Fettsäure mit 0.06 M ethanolischer KOH titriert.

Immobilisat gemäß	Beladung <sup>[a]</sup>	v(Gel) <sup>[b]</sup>	v(Gel)/v(frei)
2a	0.75	0.26	2.1
2e	0.44	0.26	2.1
3g	1.1	0.15	1.2
3l	1.5	0.31	2.4

<sup>[a]</sup> mg zur Immobilisierung eingesetztes lösliches Enzymprotein/g erhaltenes Immobilisat;

<sup>[b]</sup> Anfangsgeschwindigkeit (mmol freigesetzte Säure/h)/mg zur Immobilisierung eingesetztes Lipaseprotein, v(frei) = 0.13 mmol KOH/h · mg kommerzielle Lipase)

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Lipasen, **dadurch gekennzeichnet**, daß Lipasen in einer organische Substituenten über Si—C-Bindungen enthaltenden Siliciumoxidmatrix immobilisiert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß Lipasen in Gegenwart von Siliciumverbindungen mit nicht hydrolysierbaren organischen sowie hydrolysierbaren Substituenten und Mischungen solcher Siliciumverbindungen mit solchen, die nur vollständig hydrolysierbare Substituenten enthalten, in Gegenwart mindestens eines Katalysators und ggfls. in Gegenwart mindestens eines Additivs immobilisiert werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß Siliciumverbindungen des Typs



und/oder



und/oder des Typs



in denen R und R'' ein gesättigter oder ungesättigter Alkylsubstituent mit 1 bis 18 C-Atomen oder ein aromatischer Substituent, R' ein Alkylrest mit 1–5 C-Atomen oder ein Alkalimetallatom, X ein bi- oder höher funktioneller Alkyl- oder Arylrest sowie ein Heteroatom, und Y —OH, —OR oder —Si(OR')<sub>3</sub> ist, k und l Zahlen zwischen 0 und 3 (mit k+l<4), m eine Zahl zwischen 2 und 4 (mit m=4-l-k), n eine Zahl zwischen 1 und 3, o eine Zahl zwischen 0 und 2 (mit o=3-n), p eine Zahl zwischen 2 und 4, r eine Zahl zwischen 2 und 4, q und r eine Zahl zwischen 0 und 2 mit q+r=2 und s eine Zahl zwischen 1 und 100 ist, eingesetzt werden.

4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß Siliciumverbindungen des Typs A verwendet werden, in denen R' = Alkyl oder Natrium ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß Siliciumverbindungen des Typs B verwendet werden, in denen R' = Alkyl, X = Alkylen oder Arylen ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß Siliciumverbindungen des Typs C in Kombination mit Verbindungen des Typs A eingesetzt werden.

7. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß Siliciumverbindungen des Typs A, mit R' = Alkyl oder Natrium eingesetzt werden, insbesondere Al Alkyl- oder Aryltrialkoxysilane RSi(OR')<sub>3</sub> mit R = Alkyl mit einer Kettenlänge von C1 bis C18, Alkenyl oder Aryl.

8. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß Siliciumverbindungen des Typs AII Dialkyl-, Alkylaryl- oder Diarylalkoxysilane R<sub>k</sub>R''<sub>2-k</sub>Si(OR')<sub>2</sub> mit R, R'' = Alkyl mit einer Kettenlänge von C1 bis C18, mit R' = Alkyl oder Natrium in Kombination mit Komponenten des Typs AI eingesetzt werden.

9. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß Siliciumverbindungen des Typs AIII Tetraalkoxysilane Si(OR')<sub>4</sub> mit R' = Alkyl oder Natrium in Kombination mit Silanen des Typs AI, AII, B oder C eingesetzt werden, wobei der Anteil der Siliciumatome mit einem oder mehreren organischen Substituenten mindestens 50 Atom-% bezogen auf die eingesetzte Gesamtmenge an Silicium beträgt.

10. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß Siliciumverbindungen des Typs B, in denen R' = Alkyl mit X = Alkylen, Arylen oder O ist, in Kombination mit Silanen des Typs AI, AII, C sowie B mit unterschiedlichem X verwendet werden.

11. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Katalysatoren basische Verbindungen wie Ammonium- und Alkalimetallhydroxide, Ammoniak, Ammonium- und Alkalimetallfluoride sowie Kombinationen dieser Verbindungen eingesetzt werden.

12. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Additive Proteine wie Albumin, Gelatine, Natriumcaseinat, oder Polyhydroxyverbindungen wie Polyvinylalkohol, Sorbitol, Glycerin, Polyethylenglykol, oder unlösliche organische Polymere oder anorganische Verbindungen wie Magnetit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), Celite, offenporige Sintergläser oder Kieselgur eingesetzt werden.

13. Verwendung der nach Ansprüchen 1 bis 12 hergestellten Lipasen zur Hydrolyse und/oder Umesterung von Estern sowie Veresterung von Alkoholen mit Säuren oder Säurederivaten.